

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号:21620131152476

UDC\_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

EGFR/ERK 信号通路在泡球蚴生发细胞自我更新中的作用及其分子机制

The role of EGFR/ERK signaling for the self-renewal of germinative cells of *Echinococcus multilocularis* and its molecular mechanism

戴梦雅

指导教师姓名: 王彦海 副教授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2016 年 0 4 月

论文答辩时间: 2016 年 0 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 05 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

厦门大学博硕士论文摘要库

## 目录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言 .....	1
1 多房棘球绦虫与泡状棘球蚴病简介 .....	1
1.1 多房棘球绦虫简介 .....	1
1.2 泡状棘球蚴病简介 .....	2
2 泡球蚴生发细胞多潜能性的介绍 .....	3
2.1 泡球蚴生发细胞简介 .....	3
2.2 泡球蚴生发细胞的多潜能性对泡球蚴生长发育的影响 .....	3
3 转录因子 <i>Emsox2</i> 的研究进展 .....	4
3.1 <i>Emsox2</i> 基因结构 .....	4
3.2 <i>EmSOX2</i> 的表达与定位 .....	5
3.3 <i>Emsox2</i> 的功能 .....	6
4 EGFR/ERK 信号通路的研究进展 .....	6
4.1 EGFR/ERK 信号通路简介 .....	6
4.2 EGFR/ERK 信号通路在干细胞中的功能研究 .....	8
4.3 EGF 通过 EGFR/ERK 信号通路对泡球蚴生长发育的影响.....	8
5 研究内容及意义 .....	9
第二章 EGF 对泡球蚴生长发育的影响是通过调控生发细胞的自我更新实现的 .....	11
1 材料与方法 .....	11
1.1 实验材料 .....	11
1.2 试剂与仪器 .....	11
1.3 主要试剂配制 .....	12
1.4 实验方法 .....	13
2 实验结果 .....	16
2.1 EGF 对泡球蚴生发细胞增殖的影响 .....	16
2.2 EGF 对泡球蚴生发细胞自我更新的影响 .....	16
3 讨论 .....	19
第三章 EGFR/ERK 信号通路在泡球蚴生发细胞自我更新过程中的作用.....	21
1 材料与方法 .....	21

1.1 实验材料 .....	21
1.2 试剂与仪器 .....	21
1.3 主要试剂配制 .....	21
1.4 实验方法 .....	21
<b>2 实验结果 .....</b>	<b>22</b>
2.1 EGF/EGFR 信号通路对泡球蚴生发细胞增殖的影响.....	22
2.2 EGF/EGFR 信号通路在泡球蚴生发细胞自我更新过程中的作用.....	23
2.3 ERK 信号通路对泡球蚴生发细胞增殖的影响 .....	24
2.4 ERK 信号通路在泡球蚴生发细胞自我更新过程中的作用 .....	25
<b>3 讨论 .....</b>	<b>25</b>
<b>第四章 <i>Emsox2</i> 在泡球蚴生发细胞自我更新中的作用 .....</b>	<b>28</b>
<b>1 材料与方法 .....</b>	<b>29</b>
1.1 实验材料 .....	29
1.2 试剂与仪器 .....	29
1.3 主要试剂配制 .....	30
1.4 实验方法 .....	31
<b>2 实验结果 .....</b>	<b>37</b>
2.1 DNA 受损对泡球蚴生发细胞自我更新的影响.....	38
2.2 泡球蚴生发细胞自我更新与 EmSOX2 表达的关系 .....	38
2.3 EGFR/ERK 信号通路对 EmSOX2 表达的影响.....	40
<b>3 讨论 .....</b>	<b>42</b>
<b>第五章 总结与展望 .....</b>	<b>45</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>47</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>57</b>

# CONTENT

<b>Chinese Abstract .....</b>	<b>I</b>
<b>English Abstract.....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Echinococcus multilocularis and Alveolar Echinococcosis .....</b>	<b>1</b>
1.1 Overview of Echinococcus multilocularis .....	1
1.2 Overview of Alveolar Echinococcosis.....	2
<b>2 The multipotency of Echinococcus multilocularis germinative cells .....</b>	<b>3</b>
2.1 The Echinococcus multilocularis germinative cells .....	3
2.2 The germinative cells can influence growth and development of Echinococcus multilocularis .....	3
<b>3 Advances in the studies of transcription factor <i>Emsox2</i> .....</b>	<b>4</b>
3.1 The structure of <i>Emsox2</i> .....	4
3.2 The expression and localization of EmSOX2.....	5
3.3 The function of <i>Emsox2</i> .....	6
<b>4 Advances in the studies of EGFR/ERK signaling.....</b>	<b>6</b>
4.1 Overview of EGFR/ERK signaling.....	6
4.2 The function of EGFR/ERK signaling in stem cell .....	8
4.3 EGF influence the growth and development of E.m through EGFR/ERK signaling .....	8
<b>5 Purpose and significance of this study .....</b>	<b>9</b>
<b>Chapter 2 EGF influence the growth and development of Echinococcus multilocularis through regulating germinative cells self-renewal.....</b>	<b>11</b>
<b>1 Materials and Reagents .....</b>	<b>11</b>
1.1 Materials .....	11
1.2 Reagents and instruments .....	11
1.3 Solution preparation.....	12
1.4 Methods .....	13
<b>2 Results .....</b>	<b>16</b>
2.1 The influence of EGF on geminative cells proliferation .....	16
2.2 The influence of EGF on geminative cells self-renewal.....	16
<b>3 Discussion .....</b>	<b>19</b>



---

<b>Chapter 3 The influence of EGFR/ERK signaling on germinative cells self-renewal.....</b>	<b>21</b>
<b>1 Materials and Reagent.....</b>	<b>21</b>
1.1 Materials .....	21
1.2 Reagents and instruments .....	21
1.3 Solution preparation.....	21
1.4 Methods .....	21
<b>2 Results .....</b>	<b>22</b>
2.1 The influence of EGF/EGFR signaling on geminative cells proliferation.....	22
2.2 The influence of EGF/EGFR signaling on geminative cells self-renewal.....	23
2.3 The influence of ERK signaling on geminative cells proliferation .....	24
2.4 The influence of ERK signaling on geminative cells self-renewal .....	25
<b>3 Discussion.....</b>	<b>25</b>
<b>Chapter 4 The influence of <i>Emsox2</i> on germinative cells self-renewal .....</b>	<b>28</b>
<b>1 Materials and Reagent.....</b>	<b>29</b>
1.1 Materials .....	29
1.2 Reagents and instruments .....	29
1.3 Solution preparation.....	30
1.4 Methods .....	31
<b>2 Results .....</b>	<b>37</b>
2.1 The influence of DNA damage on germinative cells self-renewal.....	38
2.2The relationship between germinative cells self-renewal and EmSOX2 expression. ....	38
2.3 EGFR/ERK signaling regulates EmSOX2 expression .....	40
<b>3 Discussion.....</b>	<b>42</b>
<b>Chapter 5 Conclusion and Prospection .....</b>	<b>45</b>
<b>Reference .....</b>	<b>47</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>57</b>

## 摘 要

多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, Em) 中绦期幼虫(泡球蚴)在人体内以类似肿瘤的方式进行不断的增殖发育, 引发严重的人兽共患泡球蚴病 (Alveolar echinococcosis, AE)。泡球蚴不断增殖发育的基础是其生发细胞的自我更新和分化能力, 这一特性类似于干细胞。表皮生长因子受体 (EGFR) 介导的 EGFR/ERK 信号通路是调控各种干细胞自我更新的主要通路之一, 在进化上具有高度的保守性。

本文利用 Realtime PCR、Western Blot、免疫组化荧光和 EdU-BrdU 双染等技术, 从以下三个方面探讨了 EGFR/ERK 信号通路在泡球蚴生发细胞自我更新中的作用及其分子机制:

(1) 宿主生长因子 EGF 能够促进泡球蚴生发细胞的增殖, 影响泡球蚴生发细胞的自我更新。

(2) EGFR/ERK 信号通路的抑制剂 CI-1033 和 U0126 能够抑制泡球蚴生发细胞的增殖, 抑制 EGF 对生发细胞自我更新的促进作用。结合本实验室的前期研究, 提示 EGFR/ERK 信号通路在泡球蚴生发细胞的自我更新中具有重要作用。

(3) *Emsox2* (多房棘球绦虫 *Sox2* 基因) 是泡球蚴生发细胞的核心转录因子之一。使用 X-ray 及 HU 处理泡球蚴囊泡, 抑制其生发细胞自我更新的同时, *Emsox2* mRNA 及 EmSOX2 蛋白的表达量明显降低, 提示转录因子 *Emsox2* 对泡球蚴生发细胞十分重要, 可能在生发细胞自我更新过程中起重要作用。此外, EGF 促进 *Emsox2* mRNA 和 EmSOX2 蛋白的表达, EGFR/ERK 信号通路的抑制剂 CI-1033 和 U0126 引起 EmSOX2 蛋白表达量的降低且抑制 EGF 促进 EmSOX2 蛋白的表达。说明 EGFR/ERK 信号通路可调节 EmSOX2 的表达。

综上所述, 本文研究发现: 宿主 EGF 通过 EGFR/ERK 信号通路调控泡球蚴生发细胞的自我更新, 该过程可能是通过调节转录因子 *Emsox2* 的表达实现的。

关键词: 泡球蚴; 生发细胞; EGFR/ERK 信号通路; *Emsox2*; 自我更新; 分子机制

## Abstract

*Echinococcus multilocularis* larvae, which spread to organ surfaces *in vivo* in a tumor-like way, could cause alveolar echinococcosis, a dangerous zoonotic parasitic diseases. The growth and development of *Echinococcus multilocularis* larvae are based on germinative cells which have strong capacities of self-renewal and differentiation. EGFR/ERK signal pathway is one of the most important signals in regulating stem cells self-renewal and it is evolutionarily conserved.

In order to research the effect and mechanism of EGFR/ERK signaling in *Echinococcus multilocularis* germinative cells self-renewal, we use Realtime PCR, Western Blot, Immunohistochemistry and EdU-BrdU detection technology to finish this task.

We get the following achievements:

(1) The cell growth factor EGF can promote germinative cells proliferation and influence germinative cells self-renewal.

(2) As inhibitors to this signal pathway, CI-1033 and U0126 could inhibit germinative cells proliferation and inhibit EGF-induced promotion in germinative cells self-renewal. Combined with our preliminary study, this reminds us that EGFR/ERK signaling plays significant role in germinative cells self-renewal.

(3) *Emsox2* is one of the key transcription factors in germinative cells. With treatment of X-ray and HU, the germinative cells self-renewal was inhibited and the expression of *Emsox2* mRNA and EmSOX2 protein were down-regulated significantly. This reminds us that transcription factors *Emsox2* may play important role in germinative cells self-renewal. Furthermore, EGF promotes the expression of *Emsox2* mRNA and EmSOX2 protein. CI-1033 and U0126 down-regulate expression of EmSOX2 protein and inhibit EGF-induced up-regulation of EmSOX2 protein expression. This reminds us that EGFR/ERK signaling can regulate the expression of EmSOX2.

All in a word, these results indicate that EGF regulates germinative cells self-renewal of *Echinococcus multilocularis* through EGFR/ERK signaling. This process may be finished through a modulation of EmSOX2 expression.

Key words: *Echinococcus multilocularis*; germinative cells; EGFR/ERK signaling; *Emsox2*; self-renewal; molecular mechanism.

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 前言

### 1 多房棘球绦虫与泡状棘球蚴病简介

#### 1.1 多房棘球绦虫简介

多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, Em) 隶属扁形动物门绦虫纲 (Class Cestoda) 圆叶目 (Cyclophyllidea) 带科 (Taeniidae) 棘球属 (*Echinococcus*), 是一种严重的人畜共患病原寄生虫, 可引起泡球蚴病 (Alveococcosis), 又称多房棘球蚴病、多房性包虫病<sup>[1]</sup>。多房棘球绦虫主要分布于北半球高纬度地区。在我国, 该病主要分布于青海、宁夏、新疆、内蒙古、四川、甘肃以及东北黑龙江等地。其流行方式主要是犬科食肉类 (狐类) 捕食啮齿类 (主要是田鼠、旅鼠等) 而产生的捕食者与被捕食者之间相互关系 (predator-prey relationship) 的自然循环<sup>[2]</sup>。

多房棘球绦虫的生活史(图 1-1) 主要包括 4 个阶段: 虫卵、六钩蚴、中绦期、成虫<sup>[3, 4]</sup>。首先, 虫卵感染中间宿主后发育成幼虫。六钩蚴钻入中间宿主肠静脉, 通过血液循环可到达肝脏, 也可更进一步到达肺、脑等器官; 接着, 在肝实质内发育成幼虫团块; 最后, 发育成中绦期幼虫泡球蚴。泡球蚴的形态多样, 大小不一。此外, 因感染的中间宿主种类不同, 有些泡囊不育, 有些内含大量原头节<sup>[5]</sup>。泡球蚴进一步发育成成虫。多房棘球绦虫主要借助啮齿类动物, 如: 小家鼠、长爪沙鼠等中间宿主以及狐、狗、狼 (主要为狐) 等终末宿主来完成整个生活史。

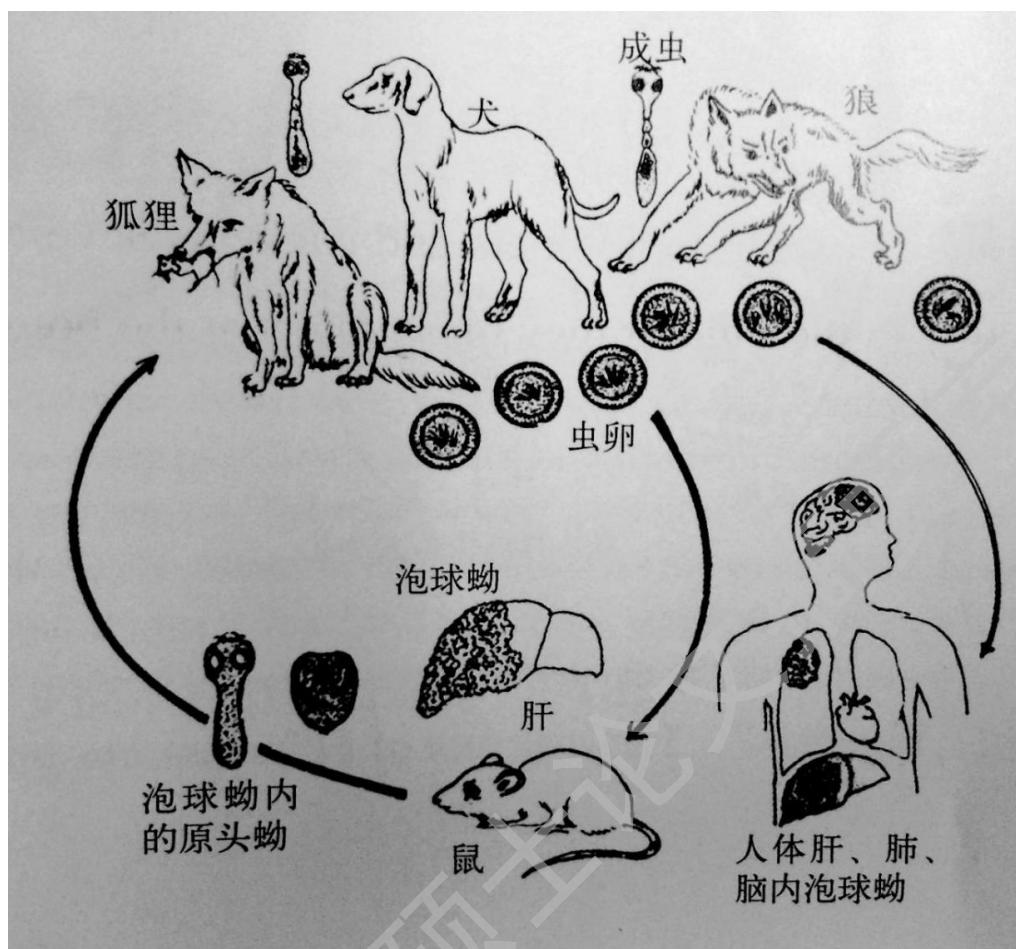


图1-1 多房棘球绦虫生活史 (温浩等, 2000)

Fig1-1. Life cycle of *Echinococcus multilocularis*  
(From Wen Hao *et al*, 2000)

## 1.2 泡状棘球蚴病简介

泡状棘球蚴病 (Alveolar Echinococcosis, AE) 是由多房棘球绦虫引起的一种人兽共患寄生虫病。由多房棘球绦虫感染动物肝脏后以增殖方式呈浸润性, 可通过血液或淋巴转移, 引起肺、脑等脏器继发性感染, 酷似恶性肿瘤, 故有虫癌及恶性棘球蚴病 (Malignant echinococcosis) 之称<sup>[5]</sup>。

人主要是由于误食被多房棘球绦虫虫卵污染的食物和水而受到感染。虫卵在宿主体内发育成六钩蚴, 经肠壁进入人的血液后发育成中绦期的幼虫, 幼虫在患者体内以肿瘤的形式发育和迁移, 并无限芽生繁殖成实质性肿块, 最终破坏各个脏器。由于手术切除肿块后并发率高、难以根治且潜伏期长, 从感染至发病一般在 20 年或以上, 因而被世界卫生组织列为世界十大寄生虫病之一<sup>[6, 7]</sup>。

目前, 泡状棘球蚴病的诊断方式主要有影像诊断及免疫诊断。影像诊断技术

有：超声波探查、CT 扫描、核素扫描及特殊造影等。而几乎所有的免疫学实验方法都用于棘球蚴病的诊断。治疗方法主要有手术治疗和药物治疗。其中，手术方法包括：B 超引导经皮穿刺、穿刺摘除内囊、经腹腔镜摘除等多种方法<sup>[8]</sup>。针对手术治疗费用高、受痛苦且易复发等缺点，吡喹酮、阿苯达唑等药物开创了治疗的新局面<sup>[9]</sup>。

尽管我国棘球蚴病的诊断、治疗技术不断提高且收到了一定的治疗效果，但在流行区的棘球蚴病预防工作仍旧不容乐观。泡状棘球蚴病的高发区虽分布于人口不多的少数民族聚居区，但因地理分布范围广泛、潜伏期长及根治困难，对人民健康及当地社会经济发展产生了严重的危害。为此，做好该病的防治工作是紧迫且必要的。首先，政府应组织科普宣传活动，对群众进行棘球蚴病的相关知识普及，包括：致病原、传播、危害、防治措施等等。其次，相关部门加强防治人员培训及队伍建设，加大流行区的早期诊断。积极开展家牧犬驱虫及卫生管理。最后，个人注意保持自我卫生。此外，鉴于多房棘球蚴的虫卵怕热，生活中，可采用热力消毒防治物品的污染<sup>[10-12]</sup>。

## 2 泡球蚴生发细胞多潜能性的介绍

### 2.1 泡球蚴生发细胞简介

动物体生长发育的过程中始终保持的一部分未分化且具有自我更新（self-renewal）及分化能力的细胞，被称为干细胞（stem cells）。可分为三类：全能干细胞（totipotent stem cell）、多能干细胞（pluripotent stem cell）及单能干细胞（unipotent stem cell）<sup>[13]</sup>。营寄生生活的绦虫纲绦虫成虫头节后的颈部区域具有未分化细胞<sup>[3]</sup>，可产生其他各类细胞，使虫体向后连续长出完整节片，被认为是全能成体干细胞(neoblast, totipotent somatic stem cell)<sup>[4]</sup>。

Galindo 等<sup>[2]</sup>的研究初步证明了泡球蚴生发细胞与成虫颈部区域的未分化细胞一样，可以产生其他各类泡球蚴细胞，具有自我更新和分化的能力，类似于全能成体干细胞。泡球蚴生发细胞的不断增殖分化形成新的泡囊，同时产生新的头节，这种特性导致泡球蚴在人体内像肿瘤一样不断增殖发育。

### 2.2 泡球蚴生发细胞的多潜能性对泡球蚴生长发育的影响

多潜能性细胞在寄生蠕虫的生长发育和生活史循环中起着关键作用，具有多

潜能性的生发细胞对于泡球蚴而言也是如此。泡球蚴在中间宿主体内形成新囊泡，囊泡的生长、头节的发生和发育及泡球蚴在中间宿主体内的播散和转移，均以多潜能性生发细胞的自我更新和分化为基础。Spiliotis<sup>[14]</sup>等的研究发现体外培养的生发细胞能够不断增殖，形成完整的新囊泡，且将这些囊泡通过腹腔注射感染小鼠后，小鼠体内能够形成新的泡球蚴和原头节。说明生发细胞多潜能性的维持在泡球蚴的生长发育过程中发挥着至关重要的作用。

### 3 转录因子 *Emsox2* 的研究进展

#### 3.1 *EmSOX2* 基因结构

*Sox* 基因家族编码一组进化上高度保守的转录因子<sup>[15]</sup>，在性别决定和分化、早期胚胎发育、神经系统发育、软骨及多种组织器官中都具有重要作用<sup>[16]</sup>。至今，在不同物种中，共克隆鉴定出近 40 个 *Sox* 基因，分成 A~J 近十个类别<sup>[17, 18]</sup>，它们具有高度的保守性。*Sox2* (SRY-related HMG box2) 属于 *Sox* 基因家族 B 组中的一员。1995 年, Yuan 等<sup>[19]</sup>首先从胚胎癌细胞的 cDNA 文库中克隆了小鼠 *Sox2* 的全长 cDNA。自此, *Sox2* 基因得到了广泛而深入的研究并发现 *Sox2* 基因是维持哺乳动物干细胞多潜能性所必需的内源性因子之一，在干细胞自我更新与诱导产生多潜能性干细胞中发挥重要作用。

在寄生虫领域，泡球蚴的生发细胞是一种全能成体干细胞，具有自我更新和分化的能力。研究维持泡球蚴生发细胞多潜能性的内源性相关基因 *Sox2* 对探讨泡球蚴生长发育的内在机制极为重要。基于 *Sox2* 的高度保守性，本实验室武坚坚等对泡球蚴 *Sox2* 基因进行了初步探究，包括泡球蚴 *Sox2* 基因的克隆和功能鉴定等。

*Emsox2* 基因含有 1185bp 的完整编码阅读框，编码 394 个氨基酸，编码序列如下，起始密码子 atg 和终止密码子 tga 分别用红色字体表示，HMG-box 保守域用蓝色字体标记，黑色箭头表示内含子的位置：

```

1  atgctgaacccttcactattttcagctgatcctccgcctgaccaagccttgggggcggctcaatct
   M L N P S L F S A D P P P D Q A L G A A Q S
67  caaccactgactattccatgaactccaccaacagtgatattgtcaccagaatctctttcgacag
   Q P T D Y S M N S T N S D I G H Q N L F R Q
133 attcattgggtcagcgacgtctaccctcgccaacaccaccgagtcacaacattgtccgactcctcc
   I H W F S D V Y P R P T P P S P T L S D S S

```



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.